

1/19/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008880205

WPI Acc No: 1992-007476/199201

Related WPI Acc No: 1993-117545; 1993-405824

XRAM Acc No: C92-003259

Prodn. of poly-beta-hydroxy-butyrate - by culturing E.coli transformed with sequence coding for PHB biosynthetic pathway

Patent Assignee: CENT INNOVATIVE TEC (INNO-N); CENT INNOVATIVE TECHNOLOGY (INNO-N)

Inventor: DENNIS D E

Number of Countries: 020 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9118993	A	19911212				199201 B
AU 9179962	A	19911231				199215
FI 9205333	A	19921124	WO 91US3547	A	19910520	199308
			FI 925333	A	19921124	
EP 535065	A1	19930407	EP 91911324	A	19910520	199314
			WO 91US3547	A	19910520	
JP 5507410	W	19931028	JP 91510838	A	19910520	199348
			WO 91US3547	A	19910520	
US 5334520	A	19940802	US 90528549	A	19900525	199430

Priority Applications (No Type Date): US 90528549 A 19900525

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; US 4396763; US 4743453; US 4950749

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9118993 A
Designated States (National): AU CA FI JP KR
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE
EP 535065 A1 E 28 C12P-007/40 Based on patent WO 9118993
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE
JP 5507410 W 7 C12N-001/21 Based on patent WO 9118993
US 5334520 A 14 C12P-007/40
FI 9205333 A C12N-000/00

Abstract (Basic): WO 9118993 A

E. coli bacterial host has a lactose utilisation system transformed by a vector contg. a deoxyribonucleic acid sequence coding for a poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic pathway.

the E. coli host is pref. capable of using whey as a C-source for producing PHB in recoverable quantities. A medium for producing PHB in a transformed E. coli host comprises minimal media and whey, the transformed E. coli includes a PHB biosynthetic pathway and is capable of using the whey as a C source for prodn. of PHB.

USE/ADVANTAGE - The methods can be used to produce high yields of PHB. The PHB can be used as a packaging material and in antibiotic, drug delivery, medical . suture and bone replacement applications.

Dwg.0/5

Abstract (Equivalent): US 5334520 A

Prodn. of poly-beta-hydroxybutyrate comprises transforming an Escherichia coli (ATCC 68329) host strain that utilises lactose metabolically with a DNA vector contg. a sequence that encodes the formation of poly-beta-hydroxybutyrate using the Alcaligenes eutrophus

biosynthetic route; then propagation of the transformed cells in a medium contg. low nutrient concns. and whey; and isolation of the expressed prod.

USE/ADVANTAGE - The prod. is a biodegradable polymer for packaging films, controlled drug delivery compsns. medical sutures and bone replacements etc. The prod. is a homopolymer comparable to polypropylene in strength, but not a likely environmental pollutant owing to its ready biodegradation.

Dwg.0/0

Title Terms: PRODUCE; POLY; BETA; HYDROXY; BUTYRATE; CULTURE; COLI; TRANSFORM; SEQUENCE; CODE; BIOSYNTHESIS; PATH

Index Terms/Additional Words: ESCHERICHIA

Derwent Class: A23; A96; B04; D16; D22

International Patent Class (Main): C12N-000/00; C12N-001/21; C12P-007/40

International Patent Class (Additional): C07H-001/06; C07H-015/12;

C08G-063/06; C12N-001/20; C12N-001/38; C12N-015/00; C12N-015/52;

C12P-007/02

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C; A05-E02; A10-A; B02-Z; B04-B02B1; B04-B04A1;

B04-C03D; B12-J08; D05-C02; D05-C03B; D05-C03D; D05-C03G; D05-H03B;

D05-H12

Plasdoc Codes (KS): 0229 0231 1291 1840 1989 2095 2325 2544 2765 2766 2768 2774

Polymer Fragment Codes (PF):

001 014 03- 04- 143 144 157 195 259 347 358 368 381 43& 463 525 643 645
023 129 184 198 209 232 254 276 276 276 277

Chemical Fragment Codes (M1):

01 H4 H401 H481 H8 J0 J014 J1 J171 J2 J273 M280 M313 M323 M331 M342
M349 M381 M393 M423 M510 M520 M530 M540 M620 M720 M903 M904 N101
N131 N135 N152 N513 Q120 Q233 R042 V743 R01207-P R01207-Q

08 M423 M430 M782 M903 Q233 V600 V631

09 M423 M710 M903 N135 Q233 V500 V540 V753

Chemical Fragment Codes (M2):

02 A111 A940 B115 B701 B713 B720 B815 B831 C101 C108 C802 C804 C805
C807 M411 M430 M782 M903 M904 M910 Q233 R01688-M

03 A111 A940 C017 C100 C730 C801 C803 C804 C805 C806 C807 M411 M430
M782 M903 M904 M910 Q233 R01706-M

04 A119 A940 B115 B701 B713 B720 B815 B831 C101 C108 C802 C804 C805
C807 M411 M430 M782 M903 M904 M910 Q233 R01753-M

05 A212 A940 C108 C316 C540 C730 C801 C802 C803 C804 C805 M411 M430
M782 M903 M904 M910 Q233 R01680-M

06 C017 C100 C500 C730 C801 C804 C806 C807 M411 M430 M782 M903 M904
M910 Q233 R01947-M

07 F012 F013 F014 F015 F019 F541 F710 H1 H100 H121 H4 H401 H481 H8 K0
L7 L721 L9 L943 M210 M211 M240 M282 M311 M312 M321 M332 M342 M373
M392 M413 M430 M510 M522 M530 M540 M782 M903 M904 M910 Q233 V0 V321
R00185-M

Chemical Fragment Codes (M6):

10 M903 P714 Q120 Q233 R042 R740

Derwent Registry Numbers: 0185-U; 1680-U; 1688-U; 1706-U; 1753-U; 1947-U

Specific Compound Numbers: R01207-P; R01207-Q; R01688-M; R01706-M; R01753-M
; R01680-M; R01947-M; R00185-M

⑫ 公表特許公報(A)

平5-507410

⑬ 公表 平成5年(1993)10月28日

⑭ Int. Cl.⁵
C 12 N 1/21
15/52

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

7236-4B

8931-4B C 12 N 15/00

A※

(全7頁)

⑮ 発明の名称 形質転換したエセリキヤ・コリにおけるポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の改良生成

⑯ 特 願 平3-510838

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)11月25日

⑱ 出 願 平3(1991)5月20日

⑲ 国際出願 PCT/US91/03547

⑳ 国際公開番号 WO91/18993

㉑ 国際公開日 平3(1991)12月12日

優先権主張 ㉒ 1990年5月25日 ㉓ 米国(US) ㉔ 528,549

㉕ 発 明 者 デニス、ダグラス・イー

アメリカ合衆国22486バージニア州、ウェイヤーズ・ケイブ、ボックス92エイ、ルート 2番

㉖ 出 願 人 センター・フォー・イノベーション・テクノロジー

アメリカ合衆国22070バージニア州、ハーンドン、ロック・ヒル・ロード 2214番、スイート600、スイアイティ・ビルディング

㉗ 代 理 人 弁理士 青山 蓑 外2名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

説 明 書 の 範 囲

このように私の発明を述べたように、私が新規なものとして請求し、特許証により確保することを望むものは以下の通りである。

1. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸を含んでいるベクターにより形質転換されたラクトース利用系を有するエセリキヤ・コリ細菌宿主。

2. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

3. 以下のATCC寄託番号68328を有する請求項2のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

4. 該宿主のエセリキヤ・コリ株HMS 174から誘導される請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

5. 該ベクターがプラスミドpTZ18Uである請求項1のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

6. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されたエセリキヤ・コリ細菌宿主であって、該エセリキヤ・コリ細菌宿主は、回収しうる量においてポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するため炭素源としてホエイを用いることができる。

7. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項6のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

8. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配

列を含んでいるベクターにより形質転換されたエセリキヤ・コリ細菌宿主であって、該エセリキヤ・コリ細菌宿主は回収しうる量においてポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するため炭素源として最小培地を用いる能力を有する。

9. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初の前の該デオキシリボ核酸配列に位置する最初の400ヌクレオシド塩基及び該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において該3つの遺伝子配列の第3の後の該デオキシリボ核酸配列に位置する第2の400ヌクレオシド塩基をほぼ含む請求項8のエセリキヤ・コリ細菌宿主。

10. 最小培地及びホエイを含む形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主にポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成するための培地であって、該形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主はポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路を含み、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の生成のため炭素源として該ホエイを利用する能力を有する。

11. 該最小培地が該培地の約20%であり、該ホエイが該培地の約40%であり、そして水が該培地の約40%である請求項10の培地。

12. 0.6%パーセントNa₂HPO₄、

0.3%パーセントKH₂PO₄、

0.1%パーセント塩化アンモニウム、

0.05%パーセント塩化ナトリウム、

5.8.4%パーセント水、

0.012%パーセント硫酸マグネシウム、

0.0005%パーセントチアミン、

0.01%パーセントカザミノ酸及び

40%パーセントホエイ溶液

をほぼ含む、形質転換されたエセリキヤ・コリ宿主にポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成させるための培地。

13. 以下の段階を含むポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造法。

エセリキヤ・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はラクトース利用系

を有し、各宿主は、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されている。

ホエイを含んでいる最小培地に24時間よりも大の期間、エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内のポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成する。

該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を放出すること、及び

該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を集めること。

14. 集めることの該段階が溶解したエセリキア・コリ細菌宿主及びポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を含んでいる該溶液を硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれたイオン試薬にさらす段階を含み、該イオン試薬は該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を固化するのに十分な濃度である請求項13の方法。

15. 該イオン溶液が1モルと1ミリモルの間にわたる濃度で塩化カルシウムである請求項14の方法。

16. 塩化カルシウムが約10ミリモルの濃度を有する請求項15の方法。

17. 以下の段階を含むポリ-β-ヒドロキシ酪酸の製造法。

エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードしているデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されており、各宿主はポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の生成のために炭素源としてホエイを用いる能力を有する。

ホエイを含んでいる最小培地に24時間よりも大の期間エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内のポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を生成する。

該培養に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を放出すること、及び

該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を集めること。

明 細 書

形質転換したエセリキア・コリにおけるポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩の改良生成

技術分野

本発明は、一般にポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩(PHB)生成経路をコードしている遺伝子を有しているベクターにより遺伝的に形質転換されたエセリキア・コリ(イー、コリ)を用いるPHBの生成に、より詳しくは形質転換されたイー、コリでのPHBの能率的生成に関する。

背景技術

PHBは環境ストレスに対する種々の細菌により生成されるエネルギー貯蔵材料であり、ポリプロピレンに似た性質を有するD-(+)-3-ヒドロキシ酪酸塩のホモポリマーである。PHBは生物分解できるので、ヒトのごみの環境影響を減らすために他のプラスチック材料とは対照的にパッケージする目的にPHPを用いることにならざる興味がある。PHBは又、抗生物質、ドラッグ・デリバリー、医学縫合及び骨置換適用に有用性を有する。PHBはアルカリゲネス・エウトロフス(エイ、エウトロフス)から商業的に生成され、商品名バイオボールの下に販売される。

スラター等による文献「クローニング・アンド・エクスプレッション・イン・エセリキア・コリ・オブ・ジ・アルカリゲネス・エウトロフスH-16ポリ-β-ヒドロキシブチラート・バイオシンセティック・パスウェイ」、ジャーナル・オブ・バクテリアエロジイ、170巻10号、1988年10月、4431-4436頁に記載されるように、イー、コリは、PHB生成経路をコードするエイ、エウトロフスから遺伝子で遺伝的に形質転換できることが示された。イー、コリは、細菌、イー、コリを取扱うについてより知られているので、即ち、イー、コリはより容易に調製され、扱われるので、エイ、エウトロフスよりもPHBを生成するのによりはるかに良好なベクターである。形質転換したイー、コリは比較的大量にPHBを発現し得た。

18. 以下の段階を含む形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主の培養に、細胞内に生成したポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を回収する方法であって、該宿主はポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードしているデオキシリボ核酸配列を含んでいるベクターにより形質転換されている。

該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解して溶液中に該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を放出すること、

硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれた十分量のイオン試薬を加えること、該十分量の該イオン試薬は該溶液中、該ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩を固化する、及び

該溶液を遠心して該固化したポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩をペレット化すること。

19. 該イオン試薬の塩化カルシウムである請求項18の方法。

20. 該塩化カルシウムが1モルと1ミリモルの間にわたる濃度で存在する請求項18の方法。

21. 該塩化カルシウムが約10ミリモルの濃度で存在する請求項20の方法。

22. ポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の最初のDNA配列に位置する最初の400のヌクレオシド塩基及びポリ-β-ヒドロキシ酪酸塩生成経路において、3つの遺伝子配列の第3の後のDNA配列に位置する第2の400のヌクレオシド塩基をほぼ含んでいる複製され、分離されたDNA配列。

23. p4Aとして設計され、寄託番号68329の下にエセリキア・コリ株HMS174がジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されたプラスミド。

24. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項13の方法。

25. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項17の方法。

26. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項18の方法。

他の材料以上のPHBの利点にもかかわらず、生成が高価であるので市場での実施を妨げて来た。最近PHBは、ルリアブロス(LB)にイー、コリを生育し、炭素源としてグルコースを用いることにより形質転換したイー、コリに生成させる。PHBの生成コストの約1/3はLBに富んだ培地及びグルコースのコストに帰することができる。高価でない炭素源を利用できればPHB生成の全体のコストは有意に減ずることができる。加えて、PHB生成の全体のコストの多くは、イー、コリ中に生成されたPHBを精製するのに帰することができる。最近、PHBは遠心、次いで細胞の機械的溶解によりPHBを放出し、高温処理でPHBを固りとし、最後にスブレードライ段階で精製された粒子を得ることにより精製する。もしイー、コリからPHBを集める高価でない方法が入手できれば、PHB生成の全体のコストは有意に減ずることができる。

発明の開示

従って、形質転換されたイー、コリにPHBを生成する改良された技術を提供することが本発明の目的である。これまでのイー、コリより高いレベルでPHBを蓄積でき、生育条件のためにホエイを含んでいる最小培地を用いることができる形質転換されたイー、コリ株を提供することが本発明の他の目的である。

イオン溶液を用い溶解したイー、コリ細胞からPHB粒子を固まらせる方法を提供することが本発明のさらに他の目的である。

本発明により、イー、コリの株、即ちイー、コリHMS174がPHB生成経路及び経路の上流及び下流側の約400の余分の塩基を有するプラスミドを含んでいるベクターにより形質転換された。イー、コリのHMS174株は、それがラクトース利用系を含み、組換え欠損で、そのためラクトース遺伝部分を含んでいるプラスミドが組換えられず構造物を不安定にしないので選ばれた。ホエイはチーズ製造からの廃棄生成物で非常に安い。形質転換したイー、コリの株がホエイを含んでいる最小培地で生育し約65%のPHBの平均収率(PHB乾燥重量/全細胞乾燥重量)を有することを示す実験がなされた。加えて、形質転換されたイー、コリに生成したPHBは種々のイオン溶液で固りうることを示す実験

がなされた。精製されたPHBを大量に回収するため、形質転換されたイー、コリ細胞はまず機械的または物理的手段、例えば音波処理により又は遠心的手段により溶解する。次いで細胞は、イオン溶液、例えば100ミリモル(mM)塩化カルシウム(CaCl_2)中でインキュベートし、PHB粒子を固める。最後に固まりは低速で培養物から遠心する。実験は、培養物中のほとんど全て(100%)のPHBがこの方法により固り、回収されることを示す。結果は、同じ型の固化がエイ、エウトロプスからPHBを回収するには不可能であるので特に刺激的である。

図面の簡単な説明

前述の及び他の目的、局面及び利点は、図面を引用して本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な記載からよりよく理解されよう。図において、

図1は、PHB蓄積が異なるプラスミド構造物を含んでいる種々のイー、コリクローンへの時間を示す棒グラフである。

図2a及び2bは最小培地及びホエイを用いた形質転換されたイー、コリにより生成したPHBの蓄積を示す棒グラフである。

図3は、 CaCl_2 を用いるPHB固化のパーセントを示す棒グラフである。

図4は、PHB固化にPHBが放射標識グルコースの存在で蓄積し、次いで固着手段に付される時間を示す棒グラフである。そして、

図5は、PHB固化へのガラス牛乳及びカルシウムの対照的効果を示す棒グラフである。

発明実施のベストモード

図面、より詳しくは図1を引用して、プラスミドp4aを含んでいるイー、コリ株HMS174は、異なるプラスミド構造物を含んでいる他のイー、コリクローンよりも短い期間により大きなパーセントのPHBを蓄積することを示す。イー、コリ株HMS174はエイル・イー、コリ・ストック・センター、バーバラ・バックマン、支配人から入手できる。p4aプラスミドはPHB生合成経路及びベクターpTZ-18U上PHB生合成経路の上流及び下流側に約400の余分の塩基

を有する。ベクターpTZ-18Uはユナイテッド・ステイツ・バイオケミカルズから入手できる。MSAは、ベクターpTZ-18U上にPHB生合成経路及び他の適合プラスミド上にファージphiX174からのE-溶解遺伝子を有する。MSAは、それがPHB生合成経路の上流に約400の余分の塩基を有することでp4aと異なる(即ちPHB生合成経路はpTZ-18Uにクローンされて「MSA」と呼ばれるpTZ-18U-PHBを作り、P4Aは、プロメガ・コーポレーションから入手できるベクターpGEM-7F+上のPHB生合成経路の上流側上のpTZ-18U-PHB400より少ない塩基である。

p4A、pTZ-18U-PHB(MSA)及びpGEM7F-PHB(GEM)クローンは、全て、慣用の分子クローン化技術を用いて引用し、組み入れられた同時係属特許出願及び雑誌論文で検討されたPHB生合成経路を含むイー、コリクローンから構成された。特許出願及び雑誌論文で開示したように、PHB生合成経路はエイ、エウトロプスから分離し、イー、コリで発現できる。生合成経路は約5キロ塩基の長さでβ-ケトチオラーゼ、NADP-結合アセトアセチルコエンザイムA(CoA)レダクターゼ及びPHBシンターゼをコードする塩基を含んでいる。図1はMSA及びGEMクローンがP4Aクローンほど多くPHBを生成しないことを示す。

イー、コリHMS174はそれがラクトース利用系を含み、そしてそれが組換え欠損であるので宿主として選んだ。組換え欠損は、ラクトース遺伝部分を含んでいるプラスミドが組換えせず、構造物を不安定にしないことを保証する。以下に述べるように、HMS174でのラクトース利用系の存在により、ホエイ、その主成分がラクトースであるチーズ製造廃棄生成物はPHB生成の炭素源として用いられる。形質転換されたイー、コリ株を作るについて、PHB生合成経路プラス ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル・ベクターpTZ-18UにクローンされたPHB生合成経路の400塩基上流及び下流であるプラスミドp4aはイー、コリHMS174に電気陰布される。p4Aプラスミドを含んでいるイー、コリの株は、1990年5月23日に12301パークローン・ドライブ・

250ul 20%カザミノ酸

20ul 20%ホエイ溶液

接種した培養は250mlじゃま板付(baffled)フラスコ中300rpmでオービタルインキュベーターシェーカーで37℃で48時間生育した。48時間のインキュベーション時間後、培養を止めて細胞を集めた。ガスクロマトグラフィーを用いてPHB含量を分析した。

図2a及び2bはそれぞれ、細胞の全重量で割った細胞当りのPHB重量として表わした細胞中に蓄積したPHBのパーセント及び最小培地を有する溶液中の異なる濃度のホエイに対し、mg/mlで表わした全PHBとして表わした細胞中のPHBの収量を示す。図2a及び2bは、非常に低濃度のホエイ、即ち溶液中2%でさえ、高濃度のPHB蓄積(即ち90%より大)及び高収量のPHB(即ち約10ml/ml)であることを示す。図2a及び2bが高い濃度のホエイを有する培地がより大きな濃度及び収量のPHBを生成する傾向があったことを示す一方、ホエイ濃度が8%を超えた後、PHB生成が下り始めることが認められた。

上の実験で、PHB生成は48時間のインキュベーション後分析されたが、有意なPHB生成が24時間のインキュベーション後、観察されたことに注意すべきである。加えて、5X最小培地処方での Na_2HPO_4 、 NH_4Cl 及び NaCl の比較濃度及び5X最小培地、2回蒸留水、 MgSO_4 、チアミン、カザミノ酸及びホエイ溶液の比較濃度は変えることができ、一方ラクトース利用系を有する形質転換されたイー、コリ宿主で依然としてPHBの生成がなされることが予期される。

ホエイが最小培地に存在するPHBの生成に炭素源としてホエイを用いることは、PHB生成にグルコースを伴う高い培地を用いる先行技術の慣行を超えてかなりの費用削減となることが期待される。PHB生合成経路をコードしているプラスミドを有し、同時係属特許出願及び雑誌論文で検討された先行技術の形質転換されたイー、コリ細胞は、それらの細胞がここに存在するラクトース利用系を有しないので、炭素源としてホエイを用いて生育できなかった。PHBは、その

ロックヴィル・Mdのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、寄託番号68829を有する。

p4aプラスミドで形質転換したイー、コリのHMS174株がホエイを含んでいる最小培地に生育できることを示す実験が行われた。用いられた最小培地はほとんどの微生物学的生物学テキストに記載されるM9最小培地であった。表1はM9最小培地の5X濃縮物の処方を表し、表示した成分の各々は1リットルフラスコに加え、水は1リットルまで加える。

表1

5X Mの最小培地処方

30g Na_2HPO_4

15g KH_2PO_4

5g NH_4Cl

2.5g NaCl

ホエイは、シグマ・ケミカルズからウシホエイの粉末として得、100mlの最終容量を有する水に20gのホエイを溶解することにより作った。攪拌は約30分間ゆるやかに加熱して行なった。次いでこの溶液をオートクレーブにかけ、遠心の間沈降した粒子を10分間10,000×gで遠心することによりペレットとした。残っている上清をホエイ炭素源として用いた。

実験では、プラスミドp4aを含んでいるHMS174イー、コリ株を平板培養から50mlのM9最小培地+ホエイ溶液に接種した。表2は、8%の最終濃度でホエイを含んでいる50mlの最小培地から処方を表す。

表2

PHB生成用最小培地+ホエイ

10ml 5X M9培地

20ml ddH₂O(2回蒸留水)

50ul 1MMgSO₄

5ul 0.5%チアミン

細菌もラクトース利用系に欠けるので、その炭素源としてホエイを用い自生の宿主、アルカリゲネス・エウトロフスに生成され得ない。加えて図1に示されるように、特殊なプラスミドp4_aで特殊なイー、コリ宿主を形質転換することは、イー、コリがPHB生成経路をもコードする異なるベクターで形質転換された場合よりも高いパーセントでPHBを生成させる。

PHBはその自生の宿主(エイ、エウトロフス)よりむしろイー、コリに生成されているので、出願人は形質転換されたイー、コリにより生成したPHBポリマーはエイ、エウトロフスに生成したPHBとは異なる物理的性質を有すると信じた。特に出願人は、形質転換されたイー、コリにより生成されたPHBが種々のイオン溶液によって固化できるかを測定するため実験を行なった。実験によって、PHBは、上で取込まれた同時係属特許出願及び特許論文で検討したように形質転換されたイー、コリに生成した。簡単に云うと、PHB一生成株を1%グルコースを含んでいるルリアブロス(LB)中24時間37℃で振盪フラスコ培養で生育する。細胞を遠心(2,000×g5分)によりペレットとし、次いで元の培養と等しい容量の水に再び懸濁する。細胞を次いで超音波処理により溶解し、種々のイオン試薬を溶液に加えた。表3は種々のイオン溶液による形質転換されたイー、コリに生成したPHBへの集合効果を示す。

表3

種々のイオン溶液によるPHBの集合

溶液*	集合程度**
KH ₂ PO ₄	++
NaCl	+
CaCl ₂	-
MgSO ₄	+++
K ₂ HPO ₄	+
MgCl ₂	++++
(NH ₄) ₂ HPO ₄	+

CaCl₂のより固まるPHBのパーセント対溶液に残るPHBのパーセントを決定するために実験がなされた。実験において、イー、コリのPHB一生成株は1%放射標識グルコースを含んでいるルリアブロス中、24時間37℃で振盪フラスコ培養で生育した。細胞は遠心(2,000×g5分)によりペレットとし、次いで元の培養に等しい容量の水に再び懸濁した。次いで細胞を超音波処理により溶解し、次いで溶液を1M塩化カルシウム溶液の添加により10mMとした。管を10分室温でインキュベートし、次いで400×g2分間遠心した。固化したPHB粒子がペレット化し、一方多くの細胞残骸が上清液に残った。次いで上清を吸引した。ペレット及び上清におけるPHBの分配を測定するためペレットと上清を毛细管ガスクロマトグラフィー又は液体シンチレーション計数を用いて測定した。

図3は培養におけるほとんど全て(100%)のPHBが上記方法により固化し回収されたことを示す。この実験でPHBの量はガス毛细管クロマトグラフィーでのみ測定した。この実験はフラスコの容量が固化の程度に影響するかどうかを測定するため幾つかの細胞容量で行ない、全ての容量において、全てのPHBが固化し、遠心により実質的にペレット化することが判った。

図4は培養は固化に十分な時間起こさせることが極めて重要であり、さもないと収率が減ずることを示す。溶液を10mM CaCl₂に調節した後、たつぷり10分インキュベーション時間を取り、ペレット及び上清フラクションを調節後2分間隔で計数した。図4は、CaCl₂添加後初めの数分間は上清に存在するPHBの量はペレットにおけるものより確かに大であることを示す。しかしながら8分後(ペレット中に測定されたPHBの量は、平らになり始める)ペレットにおけるPHBの量は、上清フラクションにおけるものよりずっと多い。この時点で、この実験は、そのほとんどが14C-グルコースとしてPHBに取込まれ(約60%に取込まれる)が、その後からは溶解性物質として存在する放射性14炭素を測定することに注意すべきである。従って、ほとんど全てのPHBが沈澱しても溶解性放射性グルコースのために依然として上清に多くの数の計数が存在

持表平5-507410 (4)

MgOAc	++++
NaOAc	++
KCl	-
KOAc	-
CaCl ₂	++++
(NH ₄)OAc	-

*全ての溶液は1Mの最終濃度であった。**固りは各集合体のミクログラフを用いて主観的に格付けした。「++++」は最善の固りを示し、「+」は最低量の固りを示す。「-」は固りのないことを示す。

表3は幾つかのイオン溶液が形質転換されたイー、コリに生成したPHBを固化することを示す。最善の固化剤は固りの速度及び大きさに関する主観的判定に基づきCaCl₂であった。CaCl₂の固化効果は、その自生エイ、エウトロフスに生成したPHBを固化しない(即ち、PHB粒子は溶解したアルカリゲネスH16エウトロフスから得られた、塩化カルシウムで処理して固化が観察されない実験がなされた)。

実験はPHBを固化するのに用いるCaCl₂の理想的濃度を決定するためになした。実験において、形質転換されたイー、コリ細胞を調製し、上述したように溶解した。次いで溶液は、1M貯蔵CaCl₂溶液を用い異なるmM CaCl₂濃度とした。低濃度のCaCl₂、例えば1mMでは、PHB粒子を固化するのに非常に長時間を要し、少しの固化体しか生成しなかった。高濃度のCaCl₂、例えば100mM及びそれ以上では、固化はほとんど瞬間的に起こり、大きな「管のブレイク」様粒子となり、管の底に覆もった。しかしながら高濃度のCaCl₂で得られた固りは大量の細胞残骸を有するように見えた。従って高濃度のCaCl₂は固化に望ましくない。中濃度のCaCl₂、例えば5mMないし30mMを用いた場合、ペレットを作った培地の固化が5ないし15分の短いインキュベーションで起きた。固化物形成の速度及び大きさの点で最良の固化結果を生ずるために10mM CaCl₂の使用が決定された。

する。

図5は、PHBの固化を核形成剤、例えばバイオ101から入手できるガラスミルクの添加により強めることができることを示す。図5において、ペレット及び上清の分当りの計数(CPM)を表わし、「+ga.+Ca」はガラスミルク及び10mM CaCl₂の存在でのPHB固化を示し、「-ga」はガラスミルクは存在せず10mM CaCl₂の存在でのPHB固化を示し、「-ga.-Ca」はガラスミルク及びCaCl₂の不存在でのPHB固化を示し、そして「-Ca」はガラスミルクの存在下、CaCl₂の不存在でのPHB固化を示す。図5から、核形成剤の添加による固化の強化は、それほど大きくなり、従って、大量の生成計画ではこのような剤の使用によって大きな利益が与えられることはないことが判る。

本発明は、大量のPHBを蓄積できる形質転換されたイー、コリ株を処理し一方、PHB生成のため安価な炭素源、例えばホエイを使用し、イオン溶液、例えばCaCl₂がPHBを固化するのに使用できるその好ましい実施態様に関して記載されたが、この分野の当業者は本発明が添付された請求の範囲の精神及び範囲内で修飾して実施できることを理解するであろう。

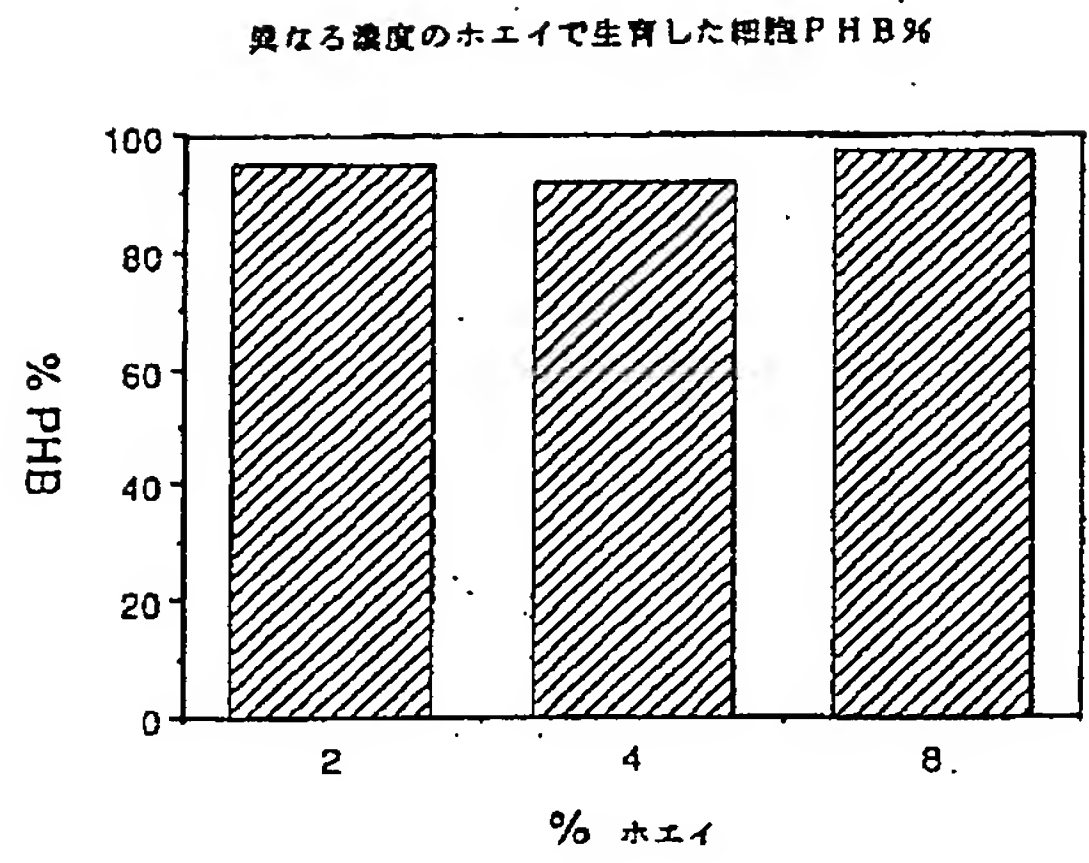
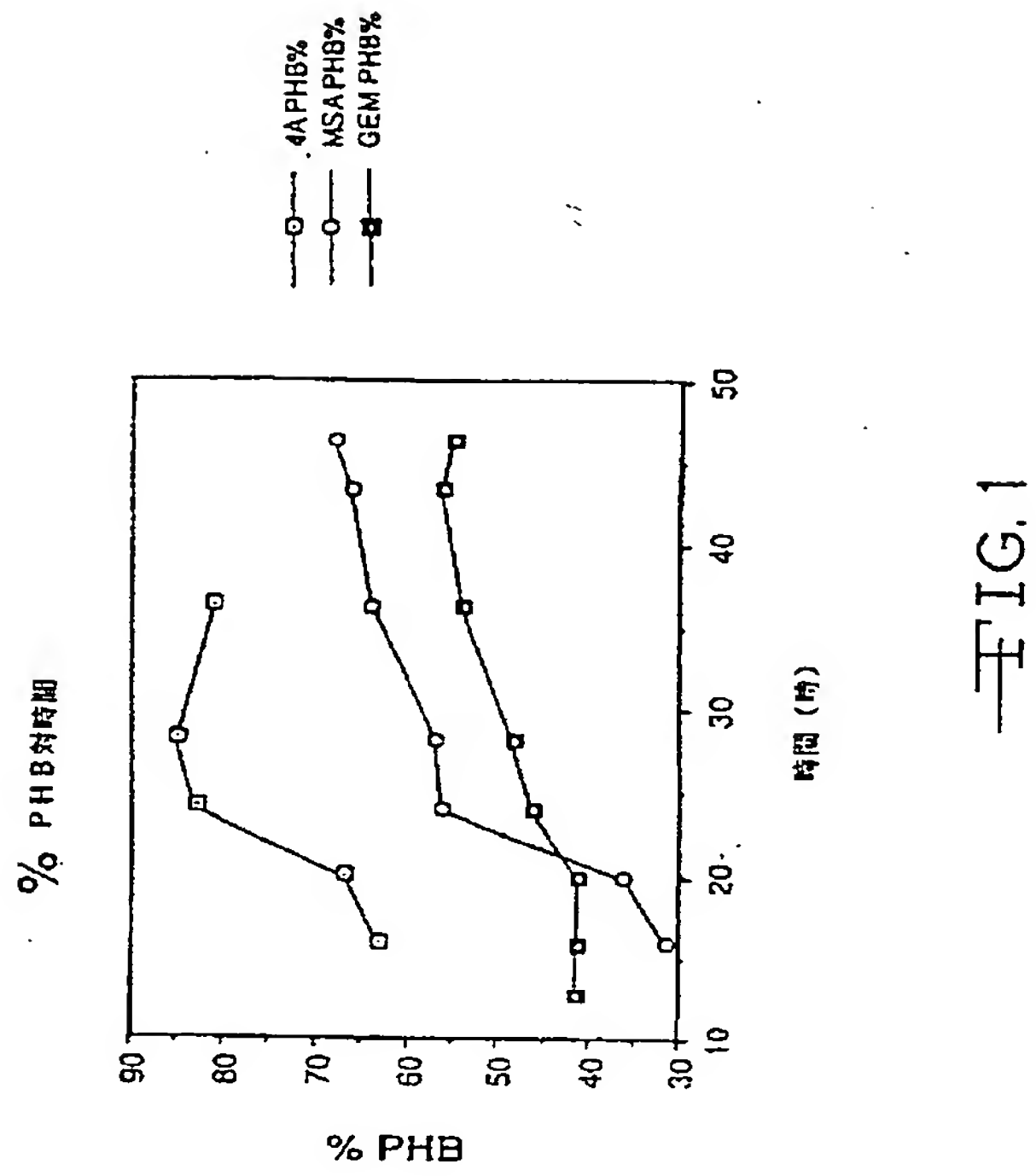


FIG. 2a

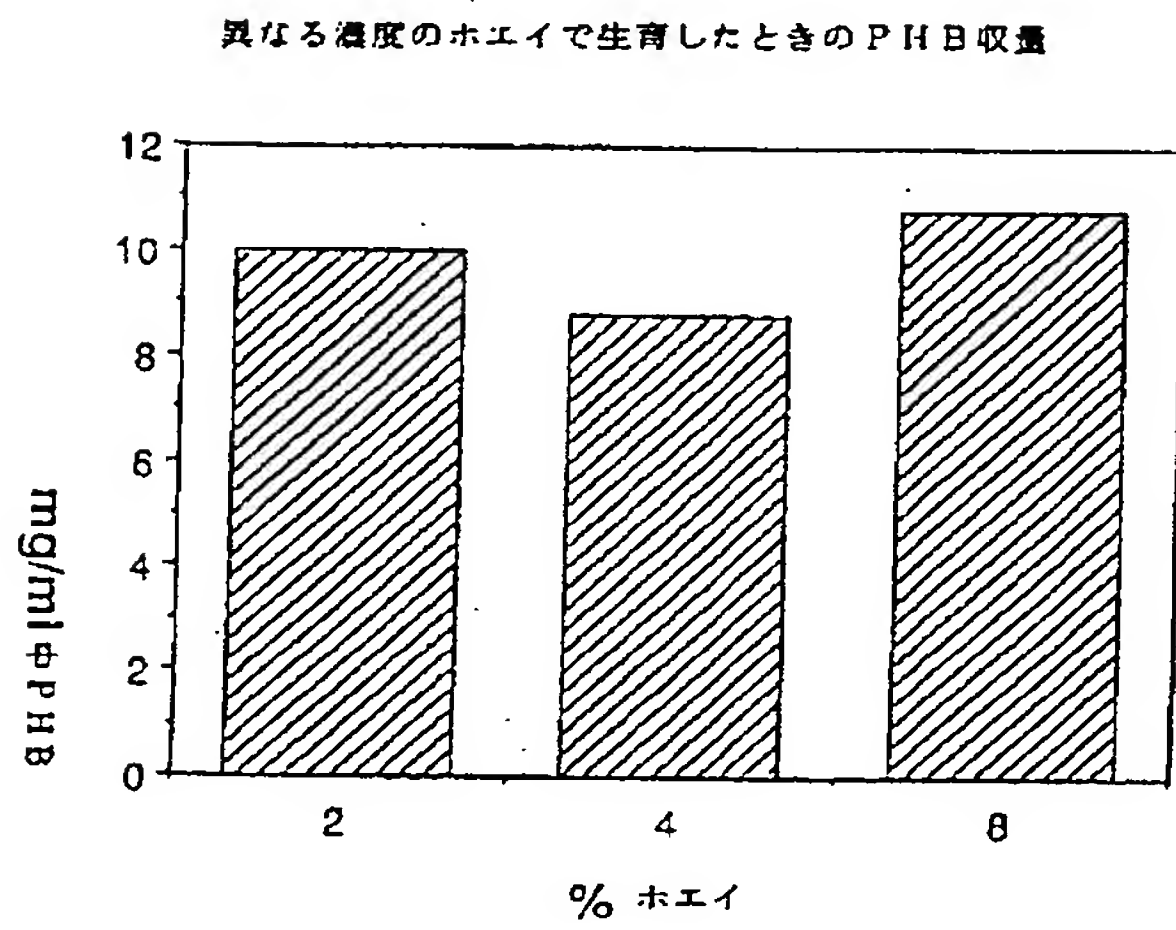
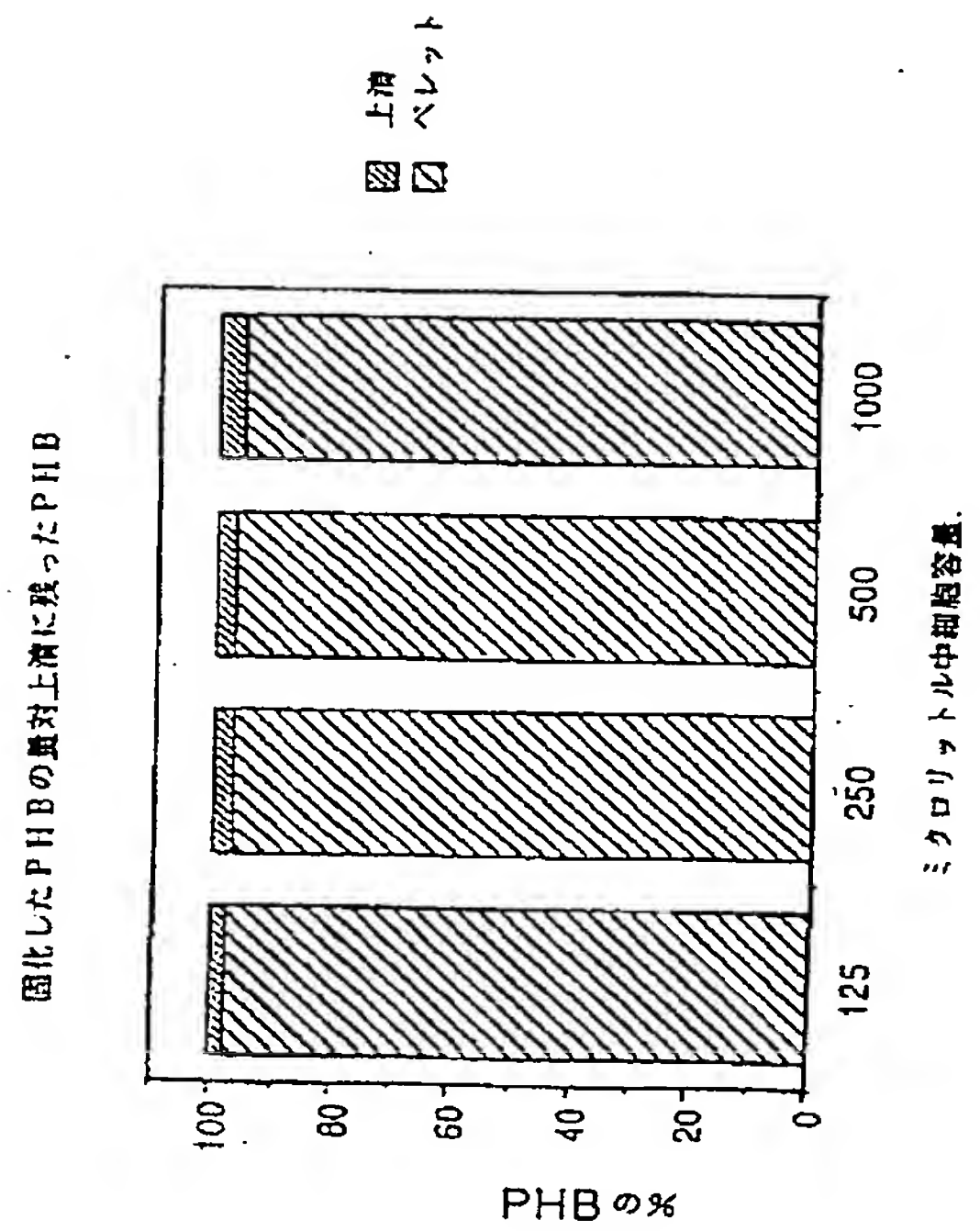


FIG. 2b



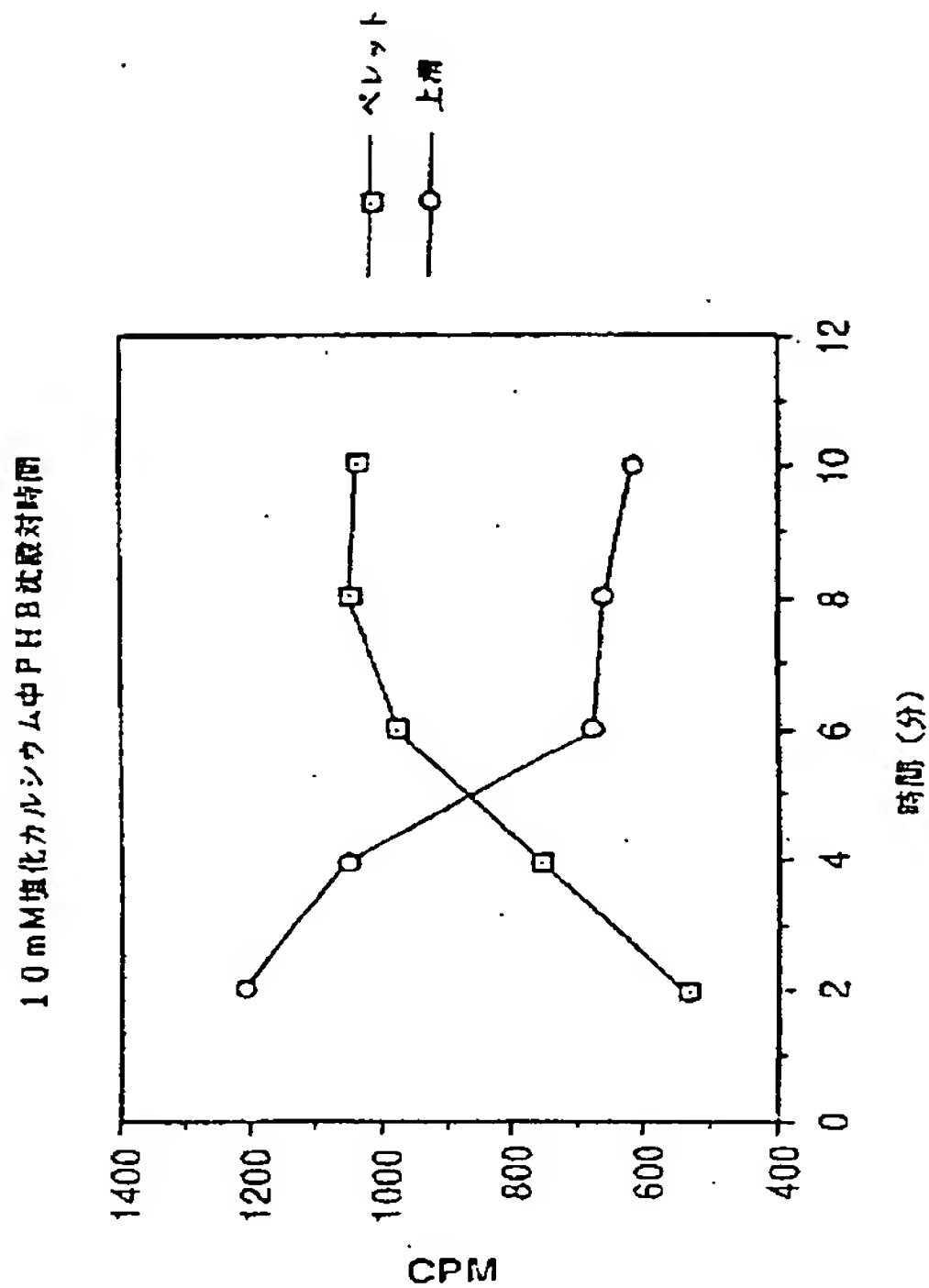


FIG. 4

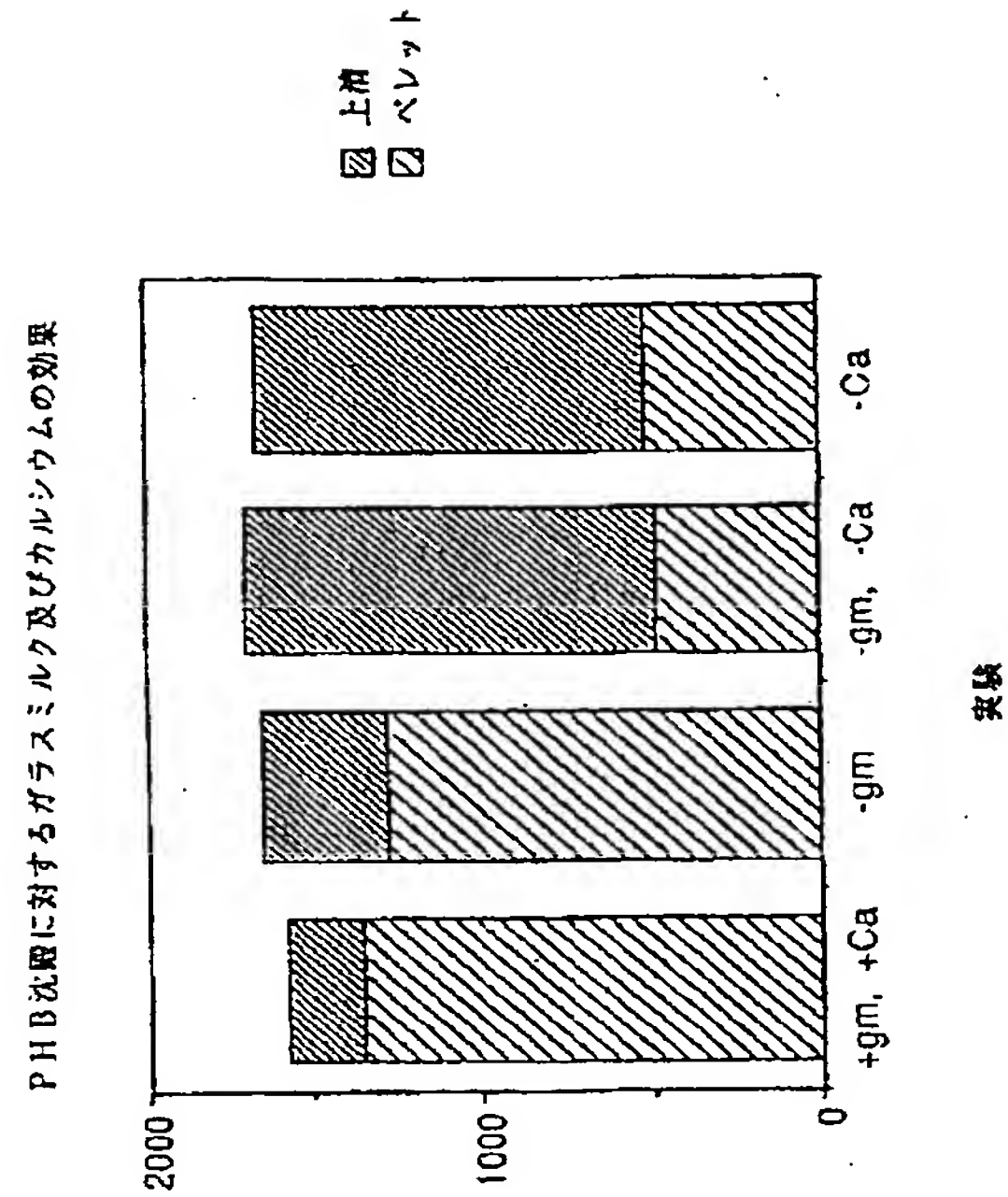


FIG. 5

要約書

方法はPHB生成経路をコードしている遺伝子を含む形質転換されたイー。コリ宿主からPHBの精製を増強することを提供する。PHBをコードしている遺伝子をラクトース利用系を含む宿主に挿入することによりホエイを含んでいる安価な最小培地をPHB生成のための食物及び炭素源として用いることができる。PHB生成経路プラス経路において、最初と最後の遺伝子のどちらかの側の400の余分の塩基をコードするプラスミド、p4Aは、宿主に挿入され、他のプラスミド構造物よりも短時間に大量のPHB蓄積を生成することを示した。CaCl₂は形質転換されたイー。コリ宿主に生成したPHBを固定するための効果的な固定剤であることを示した。

国際調査報告

1. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) as to both physical and chemical nature: 1PC(5): C12P7/40, 7/02; C12B1/20, 15/00; C07H15/12, 1/06 U.S. CL.: 435/136, 155, 263, 252.3, 252.33, 280, 320.1; 536/1.1, 26, 27, 28, 29, 124, 127	
2. FIELD SEARCHED	
Classification System: U.S.C.L.	Classification Symbols: 435/136, 155, 263, 252.3, 252.33, 280, 320.1; 536/1.1, 26, 27, 28, 29, 124, 127
3. DOCUMENTS RELEVANT TO THIS INVENTION Documents considered relevant to the present invention are listed in the following table:	
Online Search Words: poly hydroxybutyrate, transform? recombin?, clone?, bacteria, ferment?, whey, agglomerat?, magnesium, calcium, ion?	
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category: I JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 170, No. 10, issued October 1988, Slater et al., "Cloning and Expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 Poly-beta-Hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway", pages 4431-4436, see entire document.	Relevance to Claim No. 1: 1-26
TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Vol. 5, issued September, 1987, Byrom, "Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics", pages 246-250, see entire document.	1-26
U.S.A. 4,743,433 (Abern et al.) 10 May 1988, see Abstract.	10-13, 17
Ayers et al., "Microbiology of foods" published 1980 by W.H. Freeman and Company (San Francisco), see pages 191-192.	10-13, 17
U.S.A. 4,306,763 (Tsuchiya et al.) 02 August 1983, see column 1, lines 29-31 and 43-47.	10-21
P.Y. U.S.A. 4,930,749 (Johal et al.) 21 August 1990, see abstract.	14-16, 18-21
5. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention relates to a method for producing polyhydroxybutyrate (PHB) in a host cell. The method comprises: (a) providing a host cell; (b) introducing a plasmid into the host cell, the plasmid comprising a gene for the production of PHB; (c) culturing the host cell under conditions suitable for the production of PHB; and (d) recovering the PHB from the host cell.	
6. CERTIFICATION Date of the Patent Application: 04 September 1991 International Search Report: 17 SEP 1991 Inventor: ISAVIS Examiner: Stephen Zinner	

International Application No. PCT/US91/03547

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

--	--	--

☐ **OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNRESEARCHABLE**

The International Searching Authority has not been satisfied in respect of certain claims under Article 17(2) (b) for the following reasons:

☐ Claim numbers: . . . because they relate to subject matter not intended to be examined by this Authority, namely:

☐ Claim numbers: . . . because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out in conformity:

☐ Claim numbers: . . . because they are dependent claims not drafted in accordance with the norms and standards of PCT Rule 6.4(d).

☒ **OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

I. claims 1-9, 13-17, 24, 25 drawn to a first product (host) and first process of use (producing PHB).

II. Claims 10-12 drawn to a second product (culture medium).

See attached sheet.

☒ As all relevant additional search fees have already been paid by the applicant, the International Searching Authority has carried out a partial search of the international application.

☒ As only some of the relevant additional search fees have already been paid by the applicant, the International Searching Authority has carried out a partial search of the international application for which fees were paid, namely claim(s):

☐ No relevant additional search fees have already been paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim number(s):

☐ As all searchable claims could be searched without effect justifying an additional fee, the International Searching Authority did not have to conduct a partial search.

Remarks on Prior Art:

☐ The additional search fees were submitted by applicant's protest.

☐ The protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (previously Form 2) (Rev. 11-97)

CONTINUATION SECTION VI

- III. Claims 18-21, 26 drawn to second process (recovering PHB).
- IV. Claim 22 drawn to a third product (DNA sequence).
- V. Claim 23 drawn to a fourth product (plasmid vector).

第1頁の続き

⑥Int. Cl. 3

識別記号

庁内整理番号

C 12 P 7/62
 //(C 12 P 7/62
 C 12 R 1:19)

8114-4B

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)1月12日

【公表番号】特表平5-507410

【公表日】平成5年(1993)10月28日

【年通号数】

【出願番号】特願平3-510838

【国際特許分類第6版】

C12N 15/00

1/20

1/21

C12P 7/62

/(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12P 7/62

C12R 1:19)

【F I】

C12N 15/00

1/20 A

1/21

C12P 7/62

手 続 補 正 書

10. 5. 20

平成 年 月 日

特許庁長官 荒井 秀 光 殿

1. 事件の表示 平成3年特許願第510838号

2. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 センター・フォー・イノベーション・テクノロジー

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏 名 (5995) 弁護士 中 村 修

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正対象書類名 明細書

6. 補正対象項目名 請求の範囲

7. 補正の内容 別紙記載の通り

請求の範囲

1. ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸を含むベクターにより形質転換されたラクトース利用系を有するエセリキア・コリ細菌宿主。
2. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の400ヌクレオチド塩基及び該ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路の該3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
3. ATCC寄託番号68329を有する請求項2記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
4. 該宿主がエセリキア・コリ株HMS174から誘導される請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
5. 該ベクターがプラスミドpTZ18Uである請求項1記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
6. ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主であって、同収可能量のポリマーヒドロキシ酪酸塩を生成するための炭素源としてホエイを利用する能力を有することを特徴とするエセリキア・コリ細菌宿主。
7. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の400ヌクレオチド塩基及び該ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路の該3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項6記載のエセリキア・コリ細菌宿主。
8. ポリマーヒドロキシ酪酸塩生成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主であって、同収可能量のポリマーヒドロキシ酪酸塩を生成するための炭素源としてホエイ

- 地を利用する能力を有することを特徴とする上記エセリキア・コリ細菌宿主、
9. 該デオキシリボ核酸配列が、該ポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第1の400ヌクレオチド塩基及び該ポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置する該デオキシリボ核酸配列内の第2の400ヌクレオチド塩基を含む請求項8記載のエセリキア・コリ細菌宿主、
 10. 最小培地及びホエイを含む形質転換されたエセリキア・コリ宿主中においてポリマーヒドロキシ酸塩基を生成するための培地であって、該形質転換されたエセリキア・コリ宿主は、ポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路を含み、ポリマーヒドロキシ酸塩基を生成するための炭素源として該ホエイを利用する能力を有する、上記培地、
 11. 該最小培地が該培地の20%であり、該ホエイが該培地の40%であり、および水が該培地の40%である請求項10記載の培地、
 12. 0.6%Na₂HPO₄、
0.3%KH₂PO₄、
0.1%塩化アンモニウム、
0.05%塩化ナトリウム、
5g/l水、
0.012%硫酸マグネシウム、
0.0005%サアミン、
0.01%カザミノ酸及び
40%ホエイ溶液
を含む、形質転換されたエセリキア・コリ宿主中においてポリマーヒドロキシ酸塩基を生成させるための培地、
 13. 以下の段階を含むポリマーヒドロキシ酸塩基の製造法：
エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はラクトース利用系を有し、各宿主は、ポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されている；

該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解して溶液中に該ポリマーヒドロキシ酸塩基を放出すること；

硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれた十分量のイオン試薬を加えること、該十分量の該イオン試薬は該溶液中、該ポリマーヒドロキシ酸塩基を固定する；及び

該溶液を濾過して該固定したポリマーヒドロキシ酸塩基をペレット化すること。

19. 該イオン試薬が塩化カルシウムである請求項18記載の方法、
20. 該塩化カルシウムが1モル〜1ミリモルの間の濃度を有する請求項18記載の方法、
21. 該塩化カルシウムが10ミリモルの濃度を有する請求項20記載の方法、
22. ポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の最初の遺伝子配列より前に位置するDNA配列内の第1の400のヌクレオチド塩基及びポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路の3つの遺伝子配列の3番目の遺伝子配列より後に位置するDNA配列内の第2の400のヌクレオチド塩基を含む、複製され、分離されたDNA配列、
23. エセリキア・コリ株HMS174により寄託番号58329の下にシ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された、p4Aという名称のプラスミド、
24. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項18記載の方法、
25. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項17記載の方法、
26. ベクターがp4Aプラスミドを含む請求項18記載の方法、

ホエイを含む最小培地に24時間より長い期間、エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内にポリマーヒドロキシ酸塩基を生成する；

該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリマーヒドロキシ酸塩基を放出すること；及び

該ポリマーヒドロキシ酸塩基を採取すること。

14. 採取する該段階が、溶解したエセリキア・コリ細菌宿主及びポリマーヒドロキシ酸塩基を含む該溶液を硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれたイオン試薬にさらす段階を含み、該イオン試薬は該ポリマーヒドロキシ酸塩基を固定するのに十分な濃度である、請求項13記載の方法、

15. 該イオン試薬が1モル〜1ミリモルの間の濃度の塩化カルシウムである請求項14記載の方法、

16. 塩化カルシウムが10ミリモルの濃度を有する請求項15記載の方法、

17. 以下の段階を含むポリマーヒドロキシ酸塩基の製造法：

エセリキア・コリ細菌宿主の培養を供給すること、各宿主はポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されており、各宿主はポリマーヒドロキシ酸塩基を生成するための炭素源としてホエイを利用する能力を有する；

ホエイを含む最小培地に24時間より長い期間エセリキア・コリ細菌宿主の該培養を生育すること、該エセリキア・コリ細菌宿主の各々は細胞内にポリマーヒドロキシ酸塩基を生成する；

該培養中に該エセリキア・コリ細菌宿主を溶解し、溶液中に該ポリマーヒドロキシ酸塩基を放出すること；及び

該ポリマーヒドロキシ酸塩基を採取すること。

18. 以下の段階を含む、形質転換されたエセリキア・コリ細菌宿主の培養中の、細胞内に生成したポリマーヒドロキシ酸塩基を回収する方法であって、該宿主はポリマーヒドロキシ酸塩基合成経路をコードするデオキシリボ核酸配列を含むベクターにより形質転換されていることを特徴とする上記方法；